

## 一体型電極及び当該一体型電極を備える細胞固定化器

### 発明の背景

#### 発明の分野

本発明は、単離細胞及び／又は培養細胞の電気生理的活動に起因する電気信号を検出するための一体型電極及び当該一体型電極を備える細胞固定化器に関する。

#### 関連技術の説明

従来より、細胞の電気生理的活動を検出するための技術が知られている。このような技術は、例えば細胞の電気生理的活動を指標にして薬品をスクリーニングするために用いられる。細胞の電気生理的活動とは、主として細胞のイオンチャネルの活性度をいう。細胞においては、イオンチャネルの活性度に対応するイオン透過性の変化に伴って細胞膜内外のイオン濃度が増加する。したがって、細胞内の電位変化を検出することにより、イオンチャネルの開閉時間、開閉タイミング、開閉回数等、イオンチャネルの活性度（細胞の電気生理的活動）の検出が可能となる。

細胞内の電位変化を検出する方法として、パッチクランプ法が知られている。図17は、パッチクランプ法の原理を模式的に示す断面図である。パッチクランプ法は、まず、図17(a)に示すように、例えばガラスピペット101で細胞102を吸引することによりガラスピペット101の先端に細胞102を密着させ、さらなる吸引圧によってガラスピペット101に密着している範囲内の細胞102の細胞膜を破り、ピペット101

内と細胞 1 0 2 内を同電位とする。したがって、検出手段 1 0 4 を用いて、ピペット内の電極 1 0 3 の電位を参照電極 1 0 4 の電位との差として検出することにより、細胞 1 0 2 内の電位変化を検出することができる。

しかしながら、パッチクランプ法においては、細胞の細胞膜が破壊されてしまうので、1 時間程度で細胞が死んでしまう。また、細胞膜が破壊されている細胞の状態は、生体内での状態とは大きく相違する。したがって、生体内の細胞の電気生理的活動を予測するために有用なデータを得難い。さらに、ガラスピペットを細胞に密着させる操作などに熟練した技術を要し、一つの試料の測定に多くの時間を要するので大量の薬品候補化合物を高速でスクリーニングするためには適していない。

高速の薬品スクリーニングの用途、特にファーストスクリーニング（第一候補の絞り込み）の用途には、測定の迅速性、簡便性がより重視されるため、このような用途には、平板電極を使った細胞外電位記録法が適している（特許第 2 9 4 9 8 4 5 号公報、米国特許第 5 8 1 0 7 2 5 号公報、米国特許第 5 5 6 3 0 6 7 号公報、特開平 9 - 8 2 7 3 1 8 号公報、米国特許第 5 1 8 7 0 6 9 号公報参照）。

平板電極を使った細胞外電位記録法は、生体内塩濃度組成に近い溶液中で細胞、組織片等の生体試料を平板電極上に配置し、その電極の電位変化を測定することによりイオンチャンネルを通過するイオン流を検出する。すなわち、細胞外電位記録法は、細胞の電気生理的活動が、細胞の近傍に配置された電極の電位に変化をもたらすことを利用する。

上記細胞外電位記録法は、細胞を平板電極上に配置しただけで測定することができ、細胞をガラスピペットに密着させる操作等を必要とせず、ま

た細胞の細胞膜を破壊させることもないので、簡便かつ迅速に生体内での状態に近い細胞の電気生理的活動を測定することができる。したがって、薬品的高速スクリーニング等に適している。

しかしながら、細胞の電気生理的活動に起因する電気信号の変化は非常に微弱であり、平板電極を用いた細胞外電位記録法においては、かかる信号の変化を溶液を介して検出することになるためさらに微弱化する。したがって、精度の高い測定を行うためには、細胞の電気生理的活動に起因する電気信号の変化を感度良く検出する必要がある。

感度良い検出を達成する方法として、平板電極のインピーダンスを低減させる方法が挙げられる。平板電極のインピーダンスを低減させる方法として、白金黒で被覆された電極が好適に用いられている（特開平6-78889号公報参照）。

白金黒による電極の被覆は、白金塩や白金錯体を電気分解し、白金原子が多数集合したナノ粒子群が電極表面に立体的かつ複雑に堆積されることによる。故に、白金黒は、多孔性構造を有し、電極表面は、極めて大きな表面積を有する粗面となる。したがって、電極インピーダンスが低減する。電解メッキする際に印加する電圧によって、前記ナノ粒子の粒径は異なるが、その直径は、略10 nm～1 μmの範囲内にある。

図18は、回路抵抗が300 kΩ、印加電圧が7 Vの条件下で堆積された白金黒の表面の走査型電子顕微鏡（SEM）写真である。図18において、前記ナノ粒子の直径は、略60 nm～160 nmの範囲内であることがわかる。また、図18において、明暗から判断すると、少なくともナノ粒子が高さ方向に15層以上形成されていることがわかる。よって、堆積

された白金黒の厚みは、SEM写真が捉える範囲だけでも、略 $0.9\text{ }\mu\text{m}$  ( $60\text{ nm}\times 15\text{ 層}$ ) $\sim 2.4\text{ }\mu\text{m}$  ( $160\text{ nm}\times 15\text{ 層}$ )であると推測される。また、 $1\text{ }\mu\text{m}^2$ の範囲内について見ると、最凸部と最凹部との高さの差が少なくともナノ粒子5層分はあるので、略 $0.3\text{ }\mu\text{m}$  ( $60\text{ nm}\times 5\text{ 層}$ ) $\sim 0.8\text{ }\mu\text{m}$  ( $160\text{ nm}\times 5\text{ 層}$ )程度の表面粗さ（以下、本明細書においては、 $1\text{ }\mu\text{m}^2$ 内の最凸部と最凹部との高さの差で表面粗さを規定する）を有する。

一方、電極に固定する細胞の大きさは、細胞種により異なるが、HEK 293 (Human Embryo Kidney) 細胞は、単離時で直径略 $10\sim 15\text{ }\mu\text{m}$ の球形を有し、基板に定着し張り付き、伸張すると厚みは略 $1\text{ }\mu\text{m}$ となる。したがって、図18に示した白金黒で被覆された電極の表面粗さは、細胞の厚みに対して無視できない粗さであり、電極の表面と細胞との接触面積を十分に確保できず、細胞等の微小生体試料を固定することは困難である。尚、白金黒で被覆された電極であっても、電極の表面粗さが生体試料の厚みに対して無視できるような、ある程度の厚みを有する組織片等の生体試料であれば、固定することができる。

単離細胞を電極上に固定するためには、電極の表面が、細胞の厚みに対して無視できる程度の粗さしか有さず、ほぼ平坦である必要がある。具体的には、電極の表面粗さが、単離細胞の厚みの略10%以下、一例を挙げると、 $0.1\text{ }\mu\text{m}$ 以下であることが好ましい。電気分解の条件等を調整することにより、白金黒で被覆された電極であっても、白金分子の集合体であるナノ粒子の粒径程度の表面粗さとすることができる可能性が理論上はあり得るが、この場合、電極のインピーダンスの低減効果をほと

んど得ることができず、単離細胞に由来する微弱な電気信号を感度良く検出するという課題を達成することはできない。

細胞膜を破壊することなく、その表面に単離細胞を容易に固定できる電極を備えた細胞外電位測装置も開示されているが（国際公開第W O O 2 / 0 5 5 6 5 3 号パンフレット参照）、より感度良く細胞外の電位測定が可能な電極の開発が望まれていた。

### 発明の簡単な要旨

本発明は、単離細胞及び／又は培養細胞を変性させることなく電極上に固定することができ、固定された細胞の電気生理的活動を、十分な感度で検出可能な一体型電極を提供することを目的とする。

上記目的を達成するために、本発明の一体型電極は、少なくとも一つの導電体を備えた基板、及び前記導電体からの電気信号を導出する配線部を有し、前記導電体の表面に固定された細胞の電気生理的变化に起因する電気信号を検出し得る一体型電極であって、前記導電体は、その表面の少なくとも一部が誘電体材料で被覆され、前記誘電体材料は、正荷電性の高分子材料であり、前記細胞は、単離細胞及び／又は培養細胞である。

細胞は、通常その細胞膜が、負に帯電しているので、正荷電性の高分子材料との間に静電相互作用が働く。したがって、導電体の表面が正荷電性の高分子材料で被覆されていることにより、導電体表面に細胞を固定しやすく、またより強固に固定することができる。本明細書でいう「正荷電性の高分子」とは、その高分子の  $pK_a$  以下の  $pH$  で正に帯電する高分子のことである。なお、前記誘電体材料は、細胞との間に働く静電相互作用によ

り細胞の固定化に寄与するので、細胞を変性させることがない。もちろん、細胞を殺すこともない。本明細書でいう「細胞の変性」とは、細胞膜の破壊、細胞膜および、細胞膜中または細胞膜上に存在する機能物質の化学的変性を含む。

前記誘電体材料として、例えば、ポリエチレンイミン、ポリオルニチン、及びポリリジンからなる群から選択される高分子材料を含む材料を使用し得る。または、ビグアニド基、もしくはカルバモイルグアニド基を持つ高分子材料を含む材料を使用し得る。

前記導電体は、好ましくは、白金、金、パラジウム、ロジウム、銀、タンゲステン、ITO、及びこれらの組合せからなる群から選択される材料で作製される。

また、前記一体型電極において、前記誘電体材料で被覆された前記導電体の表面の少なくとも一部が、さらに、固定化材料で被覆された構成とし得る。この場合、前記固定化材料は、前記細胞との間に静電相互作用及び／又は分子間力が働く材料であり、前記誘電体材料とは異なる材料とする。前記誘電体材料での被覆と、さらに前記固定化材料での被覆により、細胞の導電体への固定化をより容易及び／又はより強固にし得る。また、前記固定化材料は、前記細胞との間に働く静電相互作用及び／又は分子間力により細胞の固定化に寄与するので、細胞を殺すことがなく、さらに細胞を変性させることがないことは、前記誘電体材料と同様である。前記固定化材料としては、例えば細胞接着性のタンパク質を使用することができる。

前記導電体と溶液との界面の電気二重層容量は、大きいほど導電体のインピーダンスを低減させる効果が大きく好ましい。具体的には、前記導電体は、0.

1 M電解質溶液との界面の電気二重層容量が、印加電圧 0 Vにおいて、 $27 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ 以上となるようにすることが、前記細胞の電気生理的活動に起因する電気信号の検出感度の点から好ましい。

また、前記一体型電極は、前記導電体が、基板に形成された少なくとも一つの貫通孔の孔内及び／又は前記基板上面における前記貫通孔の孔周囲に形成されている構成とすることができる。この場合、前記貫通孔に細胞を捕捉することができ、または前記貫通孔の下方から細胞を吸引することができるので、細胞の固定化をより容易にすることができる。一つの前記貫通孔に対し、一つの前記導電体が形成されているように構成してもよいし、複数の前記貫通孔に対し、一つの前記導電体が形成されているように構成してもよい。

本発明の細胞固定化器は、前記一体型電極と、前記導電体の表面を含む領域で、前記細胞を培養するための溶液保持部とを備える。前記一体型電極の前記基板上に導電体が複数形成されている場合、前記溶液保持部は、一つの導電体毎に分離されてもよいし、複数の導電体毎に分離されている構成であってもよい。

本発明の上記目的、他の目的、特徴、及び利点は、添付図面参照の下、以下の好適な実施形態の詳細な説明から明らかにされる。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、第 1 の実施形態の細胞外電位測定装置の構成を模式的に示す断面図である。

図 2 は、第 1 の実施形態の細胞外電位測定装置の構成を模式的に示す、

図 1 の A－A 矢視断面図である。

図 3 は、第 1 の実施形態の細胞外電位測定装置の概略図である。

図 4 は、第 2 の実施形態の細胞固定化器のセンサ部の上面図である。

図 5 は、第 3 の実施形態の細胞固定化器の構成を模式的に示す断面図である。

図 6 は、第 3 の実施形態の細胞固定化器の構成を模式的に示す、図 5 の B－B 矢視断面図である。

図 7 は、第 4 の実施形態の細胞固定化器のセンサ部の上面図である。

図 8 は、第 5 の実施形態の細胞固定化器の構成を模式的に示す断面図である。

図 9 は、第 6 の実施形態の細胞固定化器の構成を模式的に示す断面図である。

図 10 は、第 6 の実施形態の細胞固定化器の構成を模式的に示す、図 9 の C－C 矢視断面図である。

図 11 は、第 7 の実施形態の細胞固定化器のセンサ部の上面図である。

図 12 は、印加周波数に対する実施例 1、比較例 1 のインピーダンスの測定結果を示す図である。

図 13 は、実施例 2 の測定結果（経過時間に対する電圧）を示す図である。

図 14 は、比較例 2 の測定結果（経過時間に対する電圧）を示す図である。

図 15 は、実施例 3 の実体顕微鏡写真を示す図である。

図 16 は、比較例 3 の実体顕微鏡写真を示す図である。



図 1 7 は、パッチクランプ法の原理を模式的に示す断面図である。

図 1 8 は、電気分解により堆積された白金黒の表面の S E M 写真である。

### 発明の詳細な説明

以下、図面を用いて本発明をより詳細に説明する。

(第 1 の実施形態)

[細胞固定化器の構成]

本実施形態は、細胞の電気生理的変化に起因する電気信号検出用の細胞固定化器を備えた細胞外電位測定装置に係るものである。図 1 は、本実施形態の細胞外電位測定装置の一部分を構成する細胞固定化器 1 9 の構成を模式的に示す断面図である。図 2 は図 1 の A - A 矢視断面図である。ただし、図 1 は細胞固定化器 1 9 に細胞 6 が固着されている状態を示すが、図 2 は細胞 6 を省略して示す。また、図 2 においては、センサ部 1 6 の裏面に形成されているリード線 9 を点線で示す。

細胞固定化器 1 9 は、電極（本明細書でいう「導電体」に該当する） 1 1 を備えたセンサ部 1 6（本明細書でいう「一体型電極」に該当する）及び溶液保持部 1 7 とからなる。センサ部 1 6 は、電極 1 1 及びこれに接続するリード線 9 を備えた基板 1 からなる。電極 1 1 の上面は、誘電体層 1 2 で被覆されており、リード線 9 は外部接続部 1 0 を除いてその上面が絶縁層 3 で被覆されている。リード線 9 の外部接続部 1 0 の上面は、被覆層 2 1 で被覆されている。被覆層 2 1 は、外部接続部 1 0 が曝される周囲の雰囲気に応じて、かかる雰囲気に対して耐性の強い導電性材料を選択する

ようにする。外部接続部 10 は、被覆層 21 で被覆されていることより、その耐久性が向上するが、必ずしも被覆層 21 により被覆されていなくてもよい。

電極 11 の上面形状は、好ましくは、円形もしくは正方形であって、例えば、直径もしくは一辺の長さが略  $1\ \mu\text{m} \sim 2000\ \mu\text{m}$  の範囲であり得る。電極の大きさが測定対象の細胞より大きい場合、一つの電極で複数の細胞の電気生理的活動に由来する電気信号を検出することができる。

一つの単離細胞の電気生理的活動を測定するためのセンサ部 16 においては、測定対象の細胞の大きさによるが、例えば測定対象の細胞が長径略  $15\ \mu\text{m}$  の細胞である場合には、直径略  $5\ \mu\text{m}$  の円形の電極 11 とし得る。この場合、一つの単離細胞を電極 11 上に容易に固定化することができ、一つの単離細胞の電気生理的变化に起因する電気信号を容易に検出することができるからである。

細胞固定化器 19 は、センサ部 16 上に細胞培養のための溶液保持部 17 を備える。溶液保持部 17 は、センサ部 16 上に設置された円筒状の隔壁部材 4、隔壁部材 4 の内部領域、及び当該内部領域に設置された参照電極 13 からなる。

参照電極 13 は、測定時に、細胞培養液 5 に浸漬されていればよく、予め溶液保持部 17 内に固定されている構成であってもよいし、測定時に培養液 5 内に投入され固定される構成であってもよい。例えば、図示しないが、参照電極 13 は、隔壁部材 4 の内壁に取り付けられている構成であってもよい。

基板 1 としては、好ましくは、単結晶シリコン、アモルファスシリコン、

炭化ケイ素、酸化ケイ素、窒化ケイ素などに代表される半導体材料、シリコン・オン・インシュレータ（SOI）などに代表されるこれら半導体材料の複合材料、ガラス、石英ガラス、アルミナ、サファイア、フォスファイト、炭化ケイ素、酸化ケイ素、および窒化ケイ素からなる群から選択される無機絶縁材料、ポリエチレン、エチレン、ポリプロピレン、ポリイソブチレン、ポリエチレンテレフタレート（PET）、不飽和ポリエステル、含フッ素樹脂、ポリ塩化ビニル、ポリ塩化ビニリデン、ポリ酢酸ビニル、ポリビニルアルコール、ポリビニルアセタール、アクリル樹脂、ポリアクリロニトリル、ポリスチレン、アセタール樹脂、ポリカーボネート（PC）、ポリアミド、フェノール樹脂、ユリア樹脂、エポキシ樹脂、メラミン樹脂、スチレン・アクリロニトリル共重合体、アクリロニトリル・ブタジエンスチレン共重合体、シリコン樹脂、ポリフェニレンオキサイドおよびポリスルホンからなる群から選択される有機材料により形成された基板を使用する。さらに好ましくは、単結晶シリコン、SOI、PET、またはPCにより形成された基板を使用する。

電極11を形成する電極材料としては、好ましくは、白金、金、パラジウム、ロジウム、銀、およびタングステンからなる群から選択される金属材料、酸化チタン、酸化スズ、酸化マンガン、酸化鉛、およびインジウム錫酸化物（ITO）からなる群から選択される金属酸化物材料が使用される。これらの材料から選択された1種類の材料を使用して電極11を形成してもよいし、複数種類の材料を、例えば層状に堆積させて電極11を形成してもよい。電極11上面は、表面粗さが0.1  $\mu\text{m}$ 以下となる平坦性が確保されていることが好ましく、さらに導電性高分子、または単分子膜

によって被覆することにより、上記平坦性を確保するようにしてもよい。

電極 1 1 に接続するリード線 9 を形成するリード線材料にも、上記電極材料と同様の材料を好適に使用することができる。

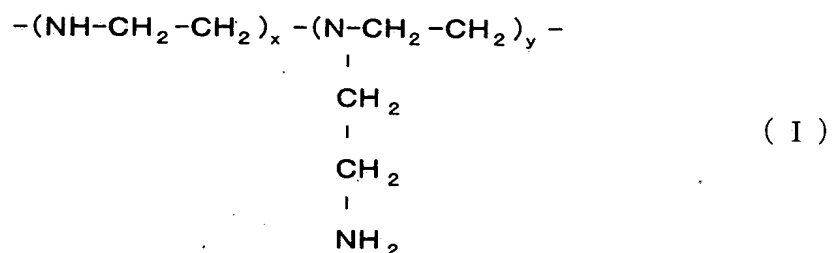
誘電体層 1 2 を形成する誘電体材料としては、ポリエチレンイミン (P E I)、ポリオルニチン (P O)、ポリリジン (P L) 等、正荷電性である高分子材料が好適に用いられる。誘電体層 1 2 は、電極 1 1 のインピーダンスを低下させるとともに、後述する実施例 3 に示すように、正荷電性高分子で形成されることにより、表面が負に帯電した細胞を、静電相互作用により引き付ける作用も併せ持つ。細胞膜表面には、シアル酸が存在するので、かかるシアル酸が細胞表面の負荷電に寄与する。本実施形態の細胞固定化器では、上記静電相互作用を利用して細胞を電極上面に固定化するので、細胞膜の破壊、細胞膜及び細胞膜中または細胞膜上の機能物質の化学的変性等を招くことがない。従って、生きた状態であって、かつ生体内での状態に近い状態の細胞の電気生理的変化を検出することができる。尚、単離細胞であっても、培養細胞であってもいずれも測定対象の細胞として使用し得る。

また、その他の強塩基性官能基を持つ高分子材料が誘電体材料として好適に用いられる。高分子中の強塩基性官能基は、細胞培養液に晒された状態で、正に帯電するので、表面が負に帯電した細胞との間に静電相互作用が働く。例えば、ビグアニド基、もしくはカルバモイルグアニジド基等の強塩基性官能基を持つ高分子材料が好適に用いられる。このようなポリマーとして、具体的にはアリルビグアニド-*c o*-アリルアミン (P A B)、アリル-N-カルバモイルグアニジド-*c o*-アリルアミン (P A C) が

挙げられる。

誘電体層 1 2 は、誘電体材料が所定の濃度で溶解された誘電体溶液を、電極 1 1 上に曝し、所定時間経過後、電極 1 1 の上面から誘電体溶液を取り除き、上面を洗浄液で少なくとも 1 回以上洗浄し、乾燥することにより形成することができる。または、上記誘電体溶液を、電極 1 1 の上面だけにスポットし、被覆する方法であってもよい。

誘電体層 1 2 による電極の被覆は、細胞の大きさに対する電極 1 1 表面の平坦性に影響を与えることはない。P E I は分子量が 6 0 0 ~ 7 5 0 0 0 0 で、下記に示す構造式 ( I ) を有する。



上記構造式 ( I ) において、 $5 \leq x \leq 9000$ 、 $5 \leq y \leq 9000$ である。

例えば、誘電体材料 1 2 として P E I を用いた場合、各官能基の原子間距離から予想される分子の厚みは 5 n m 程度である。P E I は分子構造から導かれるオーダー程度の厚みと粗さを有するのみであると推測される。尚、データは示さないが、P E I により被覆がされていない基体表面と、P E I により被覆がされた基体表面の走査型電子顕微鏡 ( S E M ) 写真を観察しても、両者においてほとんど差異は確認できない。かかる事実からも、P E I を被覆した電極 1 1 の表面粗さは、被覆されていない状態の電極 1 1 表面の粗さと同程度であることがわかる。すなわち、電極 1 1 の表面

粗さが  $0.1\ \mu\text{m}$  以下である場合、PEI により被覆された電極 11 の表面粗さも略  $0.1\ \mu\text{m}$  以下となる。したがって、PEI によって被覆された電極 11 表面は、図 18 に示した白金黒と比較にならない程平坦であり、その表面粗さは細胞の厚みに対して無視できる程度であり、細胞の電極上面への固定には障害とならない。PEI の被覆が、細胞の固定の障害とならないことは、後述の実施例 3 によっても確認される。

尚、PEI は、上記構造式に示すように、細胞培養液中で正に帯電する強塩基性官能基である  $\text{NH}_2$  基を持つため、負に帯電した細胞との間に静電相互作用が働く。

誘電体材料の被覆条件等により、電極のインピーダンスは異なるが、誘電体材料で電極を被覆することにより、電極のインピーダンスは低減する。電極のインピーダンスに寄与するインピーダンスの一つとして、電極の溶液との界面の電気二重層容量によるインピーダンスがあるが、かかる電気二重層容量が、印加電圧  $0\ \text{V}$ 、電解質濃度が  $0.1\ \text{M}$  において、好ましくは  $25\ \mu\text{F}/\text{cm}^2$  以上、より好ましくは  $27\ \mu\text{F}/\text{cm}^2$  以上となるように電極の被覆を行う。

リード線 9 を被覆し絶縁するための絶縁層 3 の材料としては、ポリイミド (PI) 樹脂、エポキシ樹脂などの樹脂が挙げられる。好ましくは、ネガティブフォトセンシティブポリイミド (NPI) などの感光性樹脂が用いられる。感光性樹脂を用いる場合、まずセンサ部 16 上面全体に感光性樹脂を塗布し、その後フォトエッチングによるパターン形成を利用して、電極 11 上及びリード線 9 の外部接続部 10 の上に形成された絶縁層 3 を取り除くことにより、該電極 11 及び外部接続部 10 を露出させ、任意の

領域に絶縁層 3 を形成することが可能となる。生産効率の点から、上述の方法により、絶縁層 3 を形成することが好ましい。

電極 1 1 からの電気信号は、参照電極 1 3 の電位を基準として測定される。通常、参照電極 1 3 は、好ましくは、その表面積が電極 1 1 の表面積以上であり、金、白金、銀―塩化銀などの材料からなるものとするが、任意の大きさ及び形状であり得る。

隔壁部材 4 は、例えばアクリルにより作製し得る。隔壁部材 4 は、電極 1 1 上面を含むセンサ部 1 6 の上面を底面とする内部領域に細胞培養液 5 を保持できる構成であれば良く、その形状は円筒状に限定されることはない。

#### [細胞固定化器の作製方法]

細胞固定化器 1 9 の作製方法の一例を示す。まず、電極材料を基板 1 上に蒸着した後、フォトレジストを用いてエッチングすることにより、電極 1 1、および対応するリード線 9 を 1 セットとしてかかるセットを複数セット有する所望のパターンを形成する。その後、外部接続部 1 0 を除くリード線 9 の上面を絶縁層 3 で被覆する。そして、電極 1 1 上面を誘電体材料で被覆し、誘電体層 1 2 を形成する。さらに、リード線 9 の外部接続部 1 0 の上面を被覆層 2 1 で被覆する。その後、基板 1 を所定角の小片に切り出し、一つの小片をセンサ部 1 6 とする。一つの小片には、電極 1 1 及びリード線 9 が 1 セット形成されているようにする。電極 1 1 のパターンは、予め前記パターンを形成させたステンシルマスクを通じて蒸着するマスク法や、リフトオフ法によって形成してもよい。このように形成されたセンサ部 1 6 の上面に隔壁部材 4 を接着し、溶液保持部 1 7 を形成する。

### [細胞固定化器の使用方法]

まず、測定対象である細胞 6 を電極 1 1 の上面に固定化する。センサ部 1 6 の最上面のうち隔壁部材 4 内の領域、少なくとも電極 1 1 の上面に誘電体層 1 2 を形成する誘電体材料とは異なる固定化材料を塗布する。固定化材料として、細胞 6 との間に静電相互作用及び／又は分子間力が働く材料を使用する。かかる材料で電極 1 1 の上面を被覆することにより、細胞 6 の電極 1 1 への固定化を容易及び／又は強固にすることができる。

電極 1 1 上面に被覆された誘電体層 1 2 は、細胞を静電相互作用により引きつける作用を有するので、かかる作用により固定化材料を塗布しなくても、電極 1 1 の上面に細胞 6 を固定化できるように構成することができるが、電極 1 1 の上面を、さらに固定化材料で被覆することにより、細胞 6 の固定化をより容易及び／又は強固にすることが可能となる。固定化材料による電極 1 1 の上面の被覆は、隔壁部材 4 を設置する前に行ってもよい。

固定化材料は、細胞の細胞を変性させることがない材料を用いる。したがって、固定化材料と細胞膜との間で、架橋反応が生じることにより、細胞を固定化するような材料は使用しない。生体内での状態に近い状態の細胞の電気生理的変化に由来する電気信号を検出するためである。固定化材料として、例えば、マトリクス材料を用いることができる。マトリクス材料として、細胞接着性のタンパク質が好適に用いられ、かかるタンパク質としてコラーゲン、フィブロネクチン、ビトロネクチン、ラミニン等が挙げられる。なお、固定化材料による電極 1 1 上面の被覆は、必ずしも行わなくもよい。



次に、溶液保持部 17 内に細胞培養液 5 を満たす。細胞培養液 5 としては、20 mM 以上 400 mM 以下の塩化ナトリウムを主成分とする生理食塩水溶液、および種々の栄養素、成長因子、抗生物質などを含有する培地、所定の化学物質、化合物、薬剤を溶解させた緩衝溶液などが好適に用いられる。

その後、細胞培養液 5 内に、所望の細胞 6 を播種する。細胞 6 の培養が進行すると同時に、付着性細胞が、センサ部 16 の最上面に固定化される。

細胞 6 が、センサ部 16 の最上面に固定化された状態で細胞の電気生理的变化に起因する電気信号の測定を開始する。電気信号の測定は、一対の電極 11、13 から検出される電気信号に基づいて、電極 11 と参照電極 13 との間の電位差を測定する。細胞は、上述のように、そのイオンチャンネルの活性に対応して、細胞膜のイオン透過性が変化し、かかる変化に伴って細胞膜内外のイオン濃度が変化する。すなわち、細胞膜内外のイオン濃度勾配が変化する。かかるイオン濃度勾配の変化に伴って、電極 11 と参照電極 13 との間の電位差が変化する。したがって、前記電位差を測定することにより、細胞の電気生理的变化を間接的に検出することができる。前記電位差は、例えば、後述する細胞外電位測定装置により測定することができる。

#### [細胞外電位測定装置の構成]

図 3 は、本実施形態の細胞外電位測定装置の概略図である。細胞外電位測定装置 40 は、制御部 39、これに接続された信号増幅部 33、刺激信号付与部 34 及び溶液駆動部 38、撮像部 35、並びに載置部 36 からなる。

載置部 36 には、細胞固定化器 19 が載置される。載置部 36 は、載置された細胞固定化器 19 を所定の温度、ガス濃度、湿度に保つ機能を備える。制御部 39 は、信号増幅部 33 から入力される信号に基づいて、細胞固定化器 19 の電極 11, 13 間の電位差を検出、記録する。また、制御部 39 は、設定された刺激条件に基づいて刺激信号付与部 34 を制御する。刺激信号付与部 34 は、D/A 変換器を備え、当該変換器、及び回線 37 を介して、細胞固定化器 19 上の細胞に電氣的刺激を印加する。細胞固定化器 19 からの電気信号は回線 32 を介して信号増幅装置 33 に導出され、ここで増幅され、周波数帯域を制限され、A/D 変換器を介して制御部 39 に入力される。

溶液駆動部 38 は、細胞固定化器 19 の溶液保持部 17 内に保持された培養液 5 を排出し、あるいは溶液保持部 17 内に培養液 5 を注入する機能を有する。必要に応じて制御部 39 により駆動される。撮像部 35 を用いて、細胞固定化器 19 上の電極 11 を撮像もしくは観察することが可能である。また、刺激信号付与部 34 は、撮像部 35 による撮像データに基づいて、出力する刺激信号を選択する構成であってもよい。

細胞外電位測定装置 40 は、刺激信号付与部 34 から細胞 6 に刺激信号付与し、その応答に対応した細胞 6 の電気生理的変化を検出することもできるし、刺激信号を与えることなく、細胞において自発的に生じる電気生理的変化を検出することもできる。

#### (第 2 の実施形態)

図 4 は、第 2 の実施形態の細胞固定化器 19 a のセンサ部 16 a の上面を示す図である。細胞固定化器 19 a は、6 行 6 列の格子状の各交点に電

極 1 1 a が配置されている構成である。第 1 の実施形態の細胞固定化器 1 9 は、センサ部 1 6 上に一つの電極 1 1 のみが形成されている構成であるが、本実施形態の細胞固定化器 1 9 a は、センサ部 1 6 a 上に複数の電極 1 1 a とこれに対応するリード線 9 a が形成されている構成である。

図 4 は、溶液保持部を省略して示すが、溶液保持部を構成する隔壁部材（第 1 の実施形態の隔壁部材 4 と同様の構成）は、一つの電極 1 1 a 毎に設置する構成、複数の電極 1 1 a 毎に設置する構成いずれであってもよい。一つの電極 1 1 a 毎に隔壁部材を設置する構成は、例えば各電極 1 1 a 上に固定された細胞の薬品応答性を測定する際に有用であり、複数の電極 1 1 a 毎に隔壁部材を設置する構成は、例えば各電極 1 1 a 上に固定化した神経細胞間でネットワークを形成させることができ、ネットワークに関する解析を行う際に有用である。

細胞固定化器 1 9 a の他の構成及び使用方法等は、第 1 の実施形態の細胞固定化器 1 9 と同様であるので、説明を省略する。

### （第 3 の実施形態）

図 5 は、本実施形態の細胞固定化器 1 9 b の構成を模式的に示す断面図である。図 6 は図 5 の B - B 矢視図である。ただし、図 5 は細胞固定化器 1 9 に細胞 6 が固定化されている状態を示すが、図 6 は細胞 6 を省略して示す。また、図 6 においては、センサ部 1 6 の下面に形成されているリード線 9 を点線で示す。

本実施形態の細胞固定化器 1 9 b は、第 1 の実施形態の細胞固定化器 1 9 とは、センサ部の構成が異なるのみなので、センサ部以外の構成は同一の符号を付して説明を省略する。

基板 1 b は貫通孔 1 4 b を有する。貫通孔 1 4 b の孔壁面 1 4 1 b、および孔開口部周縁 1 4 2 b には、電極 1 1 b が形成されている。電極 1 1 b は、真空蒸着法あるいはスパッタ法を用いて電極材料を貫通孔 1 4 の孔壁面 1 4 1 b および開口部周縁 1 4 2 b に付着させることにより形成する。電極 1 1 b の表面は誘電体層 1 2 b で被覆されている。誘電体層 1 2 による電極 1 1 b の被覆は、第 1 の実施形態と同様の方法を採用し得る。誘電体層 1 2 b による電極 1 1 b の被覆は、電極 1 1 b の 0.1 M 電解質溶液との界面の電気二重層容量が、印加電圧 0 V において、好ましくは  $25 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  以上、より好ましくは  $27 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  以上となるように行うことは、第 1 の実施形態と同様である。

センサ部 1 6 b の下面には、電極 1 1 b に接続するようにリード線 9 b が形成されている。尚、リード線 9 b は、センサ部 1 6 b の上面に形成されている構成であっても良い。

貫通孔 1 4 b は、上面開口部が下面開口部より大きい円錐台形状を有する。貫通孔 1 4 b に細胞 6 の一部が捕捉され、細胞 6 がセンサ部 1 6 b 上に密着して保持される。貫通孔 1 4 b は、円錐台形状を有することにより、細胞 6 との広い密着面積を確保することができるが、貫通孔 1 4 b の形状は、円錐台形状に限定されることはなく（例えば、第 5 の実施形態参照）、細胞 6 の一部を捕捉可能な形状であればよい。貫通孔 1 4 b の大きさは、捕捉対象となる細胞 6 に依存した任意の大きさを採用し得る。例えば、センサ部 1 6 b 上面での開口部の直径が  $10 \mu\text{m}$  以上  $500 \mu\text{m}$  以下の範囲にあり、通常は直径が  $10 \mu\text{m}$  以上  $100 \mu\text{m}$  以下の範囲にあり、好適な例示としては生体試料として用いる細胞の長径が略  $30 \mu\text{m}$  の場合、直径

が略 20  $\mu$ m である。

貫通孔 14b の形成方法は、基板 1b の材料によって異なるが、例えば基板 1b が PET からなる場合には、エキシマレーザを用いて形成することができる。また、例えば基板 1b が Si ウェハである場合には、エッチングにより形成することができる。

さらに、貫通孔 14b の下方から細胞 6 を吸引可能な吸引手段を備える構成とすることができる。このように構成することにより、貫通孔 14b における細胞 6 の捕捉をより強固なものとすることができ、浮遊性の細胞であっても貫通孔 14b に捕捉することができる。

基板 1b を形成する基板材料、電極 11b を形成する電極材料、誘電体層 12b を形成する誘電体材料、いずれも第 1 の実施形態に示した材料を使用することができる。細胞固定化器 19b の使用方法は、第 1 の実施形態の細胞固定化器 19 の使用方法と同じである。

#### (第 4 の実施形態)

図 7 は、第 4 の実施形態の細胞固定化器 19c のセンサ部 16c の上面を示す図である。尚、リード線 9c は、センサ部 16c の下面に形成されているため、上面には現れないが、図 7 においては、便宜上、リード線 9c を上面に示す。細胞固定化器 19c は、6 行 6 列の格子状の各交点に電極 11c が配置されている構成である。第 3 の実施形態の細胞固定化器 19b は、センサ部 16b 上に一つの電極 11b のみが形成されている構成であるが、本実施形態の細胞固定化器 19c は、センサ部 16c 上に複数の電極 11c とこれに対応するリード線 9c が形成されている構成である。

図 7 は、溶液保持部を省略して示すが、溶液保持部を構成する隔壁部材

(第3の実施形態の隔壁部材4と同様の構成)は、一つの電極11c毎に設置する構成、複数の電極11c毎に設置する構成いずれであってもよい。一つの電極11c毎に隔壁部材を設置する構成は、例えば各電極11c上に固定された細胞の薬品応答性を測定する際に有用であり、複数電極11c毎に隔壁部材を設置する構成は、例えば各電極11c上に固定化した神経細胞間でネットワークを形成させることができ、ネットワークに関する解析を行う際に有用である。尚、センサ部16cは、その上面にリード線9cが形成されていないので、センサ部16と隔壁部材とは必ずしも別構成である必要はなく、一体で形成することも可能である。

細胞固定化器19cの他の構成及び使用方法等は、第3の実施形態の細胞固定化器19bと同様であるので、説明を省略する。

#### (第5の実施形態)

図8は、本実施形態の細胞固定化器19dの構成を模式的に示す断面図である。細胞固定化器19dは、第1の実施形態の細胞固定化器19とは、センサ部の構成が異なるのみなので、センサ部以外の構成は同一の符号を付して説明を省略する。

基板1dは貫通孔14dを有する。貫通孔14dの孔壁面141d、および孔開口部周縁142dには、電極11dが形成されている。電極11dは、真空蒸着法あるいはスパッタ法を用いて電極材料を貫通孔14dの孔壁面141dおよび開口部周縁142dに付着させることにより形成する。電極11dの表面は誘電体層12dで被覆されている。誘電体層12dによる電極11dの被覆は、第1の実施形態と同様の方法を採用し得る。誘電体層12dによる電極11dの被覆は、電極11dの0.1M電解質

溶液との界面の電気二重層容量が、印加電圧 0 V で、好ましくは  $25 \mu\text{F} / \text{cm}^2$  以上、より好ましくは  $27 \mu\text{F} / \text{cm}^2$  以上となるように行うことは、第 1 の実施形態と同様である。

センサ部 16 d の下面には、電極 11 d に接続するようにリード線 9 d が形成されている。尚、リード線 9 d は、センサ部 16 d の上面に形成されている構成であってもよい。

本実施形態の細胞固定化器 19 d は、第 3 の実施形態の細胞固定化器 19 b とはセンサ部に形成された貫通孔の形状が異なるのみである。貫通孔 14 d は、基板 1 d の上面より形成された円錐台状の窪み 15 1 と、基板 1 d の下面より形成された円錐台状の窪み 15 2 とが一体となって形成されている。貫通孔 14 d は、このような形成方法により、基板 1 d の厚みの都合上、連続的な円錐台状の貫通孔の作製が困難であっても容易に形成することができる。

#### (第 6 の実施形態)

図 9 は、本実施形態の細胞固定化器 19 e の構成を模式的に示す断面図である。図 10 は、図 9 の C-C 矢視断面図である。ただし、図 9 は細胞固定化器 19 e に細胞 6 が固定化されている状態を示すが、図 10 は細胞 6 を省略して示す。また、図 10 はセンサ部 16 の下面に形成されているリード線 9 e を点線で示す。細胞固定化器 19 e は、第 1 の実施形態の細胞固定化器 19 とは、センサ部の構成が異なるのみなので、センサ部以外の構成は同一の符号を付して説明を省略する。

センサ部 16 e は、図 5 に示す貫通孔 14 b と同様の形状の貫通孔 14 e が一つの電極 11 e に対して複数形成されている構成を有する。図 10

に示すように（図 9 では省略する）、電極 1 1 e は誘電体層 1 2 e で被覆されている。貫通孔 1 4 e は、基板 1 e において、放射状に 2 5 個形成されている。ただし、貫通孔 1 4 e の数及び位置関係はこれに限定されない。本実施形態においては、複数の貫通孔 1 4 e に保持された細胞 6 に起因する電気信号が一つの電気信号として一つの電極 1 1 e から検出されることになる。本実施形態の細胞固定化器 1 9 e は、複数の細胞の応答を同時に検出する薬品スクリーニング等において有用である。

#### （第 7 の実施形態）

図 1 1 は、第 7 の実施形態の細胞固定化器 1 9 f のセンサ部 1 6 f の上面を示す図である。尚、リード線 9 f は、センサ部 1 6 f の下面に形成されているため、上面には現れないが、図 1 1 においては、リード線 9 f を模式的に示す。細胞固定化器 1 9 f は、6 行 6 列の格子状の各交点に電極 1 1 f が配置されている構成である。第 6 の実施形態の細胞固定化器 1 9 e は、センサ部 1 6 e 上に一つの電極 1 1 e のみが形成されている構成であるが、本実施形態の細胞固定化器 1 9 f は、センサ部 1 6 f 上に複数の電極 1 1 f とこれに対応するリード線 9 f が形成されている構成である。

図 1 1 では、溶液保持部を省略して示すが、溶液保持部を構成する隔壁部材は、一つの電極 1 1 f 毎に設置する構成、複数の電極 1 1 f 毎に設置する構成いずれであってもよい。一つの電極 1 1 f 毎に隔壁部材を設置する構成は、例えば各電極 1 1 f 上に固定された細胞の薬品応答性を測定する際に有用であり、複数電極 1 1 f 毎に隔壁部材を設置する構成は、例えば各電極 1 1 f 上に固定化した神経細胞間でネットワークを形成させることができ、ネットワークに関する解析を行う際に有用である。尚、センサ



部 1 6 f は、その上面にリード線 9 f が形成されていないので、センサ部 1 6 f と隔壁部材とは必ずしも別構成である必要はなく、一体で形成することも可能である

細胞固定化器 1 9 f の他の構成及び使用方法等は、第 6 の実施形態の細胞固定化器 1 9 e と同様であるので、説明を省略する。

以下、実施例により本発明をより具体的に説明する。これらの実施例は、本発明を限定するものではない。

#### (実施例 1)

第 6 の実施形態（貫通孔 1 4 e の個数は、図 1 0 に示すものとは異なる）の細胞固定化器 1 9 e（実施例 1）と、実施例 1 の細胞固定化器 1 9 e とは電極 1 1 e を誘電体層 1 2 e で被覆していない点のみ異なる細胞固定化器（比較例 1）とを作製し、電極の特性を調べる実験を行った。

基板 1 として 1 0 0 m m 角、厚さ 2 5  $\mu$  m の P E T フィルムを、電極 1 1 e 及びリード線 9 e の材料として金を用いた。P E T フィルム上に、パルス発振させたエキシマレーザを用いて、貫通孔 1 4 e を形成した。貫通孔 1 4 e は、各領域に 1 0 0 個ずつ、複数領域に形成した。各領域において、1 0 0 個の貫通孔 1 4 e は放射状となるように形成した。各貫通孔 1 4 e は、上面開口部の直径が 2 0  $\mu$  m、下面開口部の直径が 5  $\mu$  m の円錐台形状とした。一つの領域は、直径 1 m m の範囲内に含まれる大きさとした。尚、各領域間は、後の工程における小片の切り出しを容易とするために、隣接する領域間は左右間隔が 3 m m、上下間隔が 1 0 m m となるようにした。

そして、基板 1 e の上面の貫通孔 1 4 e の開口部より一回り大きい孔が

各貫通孔 1 4 e に対応するように形成されているステンシルマスクを通じて、電極材料である金を厚さ 2 0 n m となるようにスパッタした。その後、基板 1 e の下面に、上記と同様の方法で、リード線 9 e の形状をスパッタした。これにより、基板 1 e 上面の直径 1 m m の範囲及び貫通孔 1 4 e 内壁に形成された電極 1 1 e は、裏面に形成されたリード線 9 e に接続された。その後、一つの小片が一つの領域を含むように 1 0 0 m m 角の P E T フィルムを複数の小片に切り出した。切り出した小片についてフィルム上面に形成された電極 1 1 e 上面からリード線 9 e への導通を確認した。一つの小片を比較例 1 のセンサ部とした。

実施例 1 については、さらに以下の処理を施した。p H 8 . 4 のホウ酸緩衝液に終濃度 0 . 1 重量% となるように P E I を希釈した誘電体溶液を、センサ部上に 1 6 時間曝し、その後誘電体溶液を取り除いた。そして、センサ部表面を滅菌水で十分にリンスした。このようにして、電極 1 1 e 上面に誘電体層 1 2 e を形成したセンサ部を、実施例 1 のセンサ部とした。

実施例 1、比較例 1 のセンサ部を用いてそれぞれ細胞固定化器を作製し、細胞固定化器を含む回路のインピーダンスを測定した。インピーダンスの測定は、基準電極として白金電極を用い、溶液保持部には 0 . 1 M の塩化ナトリウム水溶液を満たし、実施例 1 および比較例 1 のセンサ部上の電極を測定電極として、電気化学測定システム H C 3 0 0 0 （北斗電工社製）を用いて、周波数を 1 H z から 2 0 k H z まで連続的に変化させて正弦波電圧を電極間に印加し、回路のインピーダンスを測定した。バイアス電圧は 0 V とし、印加電圧の振幅は 5 0 m V とした。図 1 2 に測定結果を示す。図 1 2 に示されるように、実施例 1 と比較例 1 では、インピーダンスに顕

著な違いが見られる。周波数が 3 k H z 以下では、実施例 1 のインピーダンスは、比較例 1 のインピーダンスより小さく、かかる傾向は印加周波数が低い程顕著であり、周波数が 2 0 H z 以下の低周波印加領域では、1 0 分の 1 以下であった。

本測定におけるインピーダンスは、測定電極と溶液との界面及び基準電極と溶液との界面に形成される容量、溶液抵抗、電極表面抵抗、回路抵抗等さまざまなものの合成インピーダンスである。しかしながら、図 1 2 の測定結果からは、実施例 1 と比較例 1 とのインピーダンスの違いには、周波数依存性があることがわかる。したがって、両者のインピーダンスの違いは、周波数依存性がある測定電極と溶液との界面に形成される容量によるものであることがわかる。尚、基準電極と溶液との界面に形成される容量によるインピーダンスにも周波数依存性があるが、基準電極の構成に関し、両者に差異はないため、かかるインピーダンスは、図 1 2 の測定結果におけるインピーダンスの差異には寄与していないと考えることができる。

したがって、低周波領域における実施例 1 のインピーダンスと比較例 1 のインピーダンスとの比較は、測定電極界面での容量のインピーダンスの比較であるといえ、低周波領域において実施例 1 における測定電極界面での容量のインピーダンスは、比較例 1 のものと比較して 1 0 分の 1 以下であるといえる。

上記インピーダンスの測定結果から、実施例 1 及び比較例 1 の測定電極界面の電気二重層容量を計算したところ、実施例 1 では  $165 \mu F / cm^2$ 、比較例 1 では  $10 \mu F / cm^2$  となった。電気二重層容量は印加電圧や電解質の濃度によって異なるが、上記計算値は印加電圧が 0 V であり、電解質

濃度が 0.1 M における値である。

#### (実施例 2)

実施例 1、比較例 1 と同様のセンサ部を作製し、それぞれのセンサ部に細胞接着性たん白質であるコラーゲン (Sigma P-4511) を固定化材料として電極表面を含むセンサ部上に所定の方法で 1 時間被覆した (37℃ 雰囲気下)。このように作製したセンサ部を実施例 2 (PEI 被覆有り)、比較例 2 (PEI 被覆無し) のセンサ部とした。

それぞれのセンサ部にアクリル製の隔壁部材を接着し、溶液保持領域を形成した後、溶液保持領域内を培養液で満たし、ラット大動脈由来平滑筋細胞 VSMCs A-10 (ATCC CRL-1476) を  $2 \times 10^4$  細胞 / ml の濃度となるように播種し、CO<sub>2</sub> インキュベータ中で 5 日間培養した (37℃、5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下)。培養液は DMEM + 10% FBS を用いた。実施例 2、比較例 2 のセンサ部を用いて測定される電圧 (基準電極及び測定電極間の電圧) をそれぞれ図 13、図 14 に示す。横軸は時間、縦軸は電圧 (すなわち細胞の活動を表す電位の強さ) を示す。図 13 で検出される細胞の周期的活動が、図 14 ではほとんど検出されない。尚、図 14 においても円で囲んだ箇所で周期的変化が検出されているが、図 13 と比較した場合、電気信号の変化は小さいものである。

#### (実施例 3)

実施例 1、比較例 1 と同様のセンサ部を作製し、実施例 3 (PEI 被覆有り)、比較例 3 (PEI 被覆無し) のセンサ部とした。

それぞれのセンサ部にアクリル製の隔壁部材を接着し、溶液保持領域を形成した後、溶液保持領域内を培養液で満たし、ラット大動脈由来平滑筋

細胞 A 7 r 5 を  $1 \times 10^6$  細胞 / ml の濃度となるように播種し、CO<sub>2</sub> インキュベータ中で培養した（37℃、5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下）。培養液は DMEM + 10% FBS を用いた。実施例 3、比較例 3 の 2 日間培養後のセンサ部上面の実体顕微鏡写真をそれぞれ、図 15、図 16 に示す。ラット大動脈由来平滑筋細胞 A 7 r 5 は、単離時には、溶液の圧力を等方的に受け、球形となる。そして、基板に定着後、前記細胞は、細胞内部の細胞骨格を伸張させ、紡錘形状へと変化する。図 15 と図 16 に示す実体顕微鏡写真の比較からわかるように、実施例 3 では、細胞の定着が進行しているが、比較例 3 では細胞がほとんど定着していない。すなわち、センサ基板上の電極上面を PEI で被覆するか否かによって、電極上面での細胞の定着性に差が生じることがわかる。

上記説明から、当業者にとっては、本発明の多くの改良や他の実施形態が明らかである。従って、上記説明は、例示としてのみ解釈されるべきであり、本発明を実行する最良の態様を当業者に教示する目的で提供されたものである。本発明の精神を逸脱することなく、その構造及び／又は機能の詳細を実質的に変更できる。

## クレーム

1. 少なくとも一つの導電体を備えた基板、及び前記導電体からの電気信号を導出する配線部を有し、前記導電体の表面に固定された細胞の電気生理的変化に起因する電気信号を検出し得る一体型電極であって、

前記導電体は、その表面の少なくとも一部が誘電体材料で被覆され、

前記誘電体材料は、正荷電性の高分子材料であり、

前記細胞は、単離細胞及び／又は培養細胞である、一体型電極。

2. 前記一体型電極は、前記細胞を変性させることなく前記導電体の表面に固定され得るように構成されている、請求項 1 に記載の一体型電極。

3. 前記誘電体材料は、ポリエチレンイミン、ポリオルニチン、及びポリリジンからなる群から選択される高分子材料を含む、請求項 1 に記載の一体型電極。

4. 前記誘電体材料は、ビグアニド基、もしくはカルバモイルグアニド基を持つ高分子材料を含む、請求項 1 に記載の一体型電極。

5. 前記導電体が、白金、金、パラジウム、ロジウム、銀、タングステン、ITO、及びこれらの組合せからなる群から選択される材料を含む材料からなる請求項 1 に記載の一体型電極。

6. 前記誘電体材料で被覆された前記導電体の表面の少なくとも一部が、さらに、固定化材料で被覆され、

前記固定化材料は、前記細胞との間に静電相互作用及び／又は分子間力が

働く材料であり、前記誘電体材料とは異なる材料である、請求項 1 に記載の一体型電極。

7. 前記固定化材料が、細胞接着性のタンパク質である請求項 6 に記載の一体型電極。

8. 前記導電体は、0.1 M 電解質溶液との界面の電気二重層容量が、印加電圧 0 V において、 $27 \mu\text{F} / \text{cm}^2$  以上である請求項 1 に記載の一体型電極。

9. 前記導電体が、基板に形成された少なくとも一つの貫通孔の孔内及び／又は前記基板上面における前記貫通孔の孔周囲に形成されている請求項 1 に記載の一体型電極。

10. 一つの前記貫通孔に対し、一つの前記導電体が形成されている、請求項 9 に記載の一体型電極。

11. 複数の前記貫通孔に対し、一つの前記導電体が形成されている、請求項 9 に記載の一体型電極。

12. 請求項 1 に記載の一体型電極と、前記一体型電極の前記導電体の表面を含む領域で、前記細胞を培養するための溶液保持部とを備える、細胞固定化器。

13. 前記一体型電極は前記導電体を複数備え、前記溶液保持部が、一つの導電体毎に分離されている、請求項 12 に記載の細胞固定化器。

14. 前記一体型電極は前記導電体を複数備え、前記溶液保持部が、複数の導電体毎に分離されている、請求項 12 に記載の細胞固定化器。

## 要約

単離細胞及び／又は培養細胞をその細胞膜に損傷を与えることなく電極上に固定することができ、固定された細胞の電気生理的活動を、十分な感度で検出可能な一体型電極を提供する。少なくとも一つの導電体を備えた基板、及び前記導電体からの電気信号を導出する配線部を有し、前記導電体の表面に固定された細胞の電気生理的变化に起因する電気信号を検出し得る一体型電極であって、前記導電体は、その表面の少なくとも一部が誘電体材料で被覆され、前記誘電体材料は、正荷電性の高分子材料であり、前記細胞は、単離細胞及び／又は培養細胞である。